

OBTENCION DE CULTIVOS AXENICOS DE «SCENEDESMUS OBLIQUUS»

NOTA TECNICA

Por ELISA D'ANTONI¹

RESUMEN

Una muestra de *Scenedesmus obliquus* contaminada con bacterias y hongos fue sometida a repetidos lavados con agua destilada estéril y luego tratada con solución de D.G.6.

Diluciones progresivas de la concentración original se sembraron en cajas de Petri con agar-Detmer y luego de la aparición de las primeras colonias, se hicieron estrías sobre agar-Detmer en "pico de flauta". Posteriormente dichas estrías fueron lavadas en primer lugar con solución de oxiquinolina y luego con mezcla 1:1 de p-hidroxibenzoato de metilo y p-hidroxibenzoato de propilo. Las pruebas de esterilidad sobre caldo y agar peptonado indicaron que la muestra estaba libre de contaminación para los medios citados.

SUMMARY

A sample of *Scenedesmus obliquus* contaminated with bacteria and fungi was washed several times with sterile distilled water and then treated with a solution of D.G.6.

Progressive dilutions of the original concentrations were cultivated in culture dishes (Petri dishes) which contained an agar-Detmer medium. When the first colonies developed, they were isolated and cultivated in test tubes on a slant agar. Subsequently, the experience was followed by two steps: the culture was washed

¹ Trabajo realizado con una Beca de Iniciación otorgada por el C.N.I.C.T. bajo la dirección del Ing. Agr. Enrique M. Sívori.

with a solution of oxyquinoline and then with a mixture 1 : 1 of methyl-p-hydroxybenzoate and propyl p-hydroxybenzoate.

Finally, a culture on peptone and agar-peptone media showed that the sample was free from contamination for these media.

INTRODUCCION

En la presente nota técnica se describe un método desarrollado durante el curso de investigaciones sobre factores de crecimiento en *Scenedesmus obliquus*, que actualmente se llevan a cabo en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Naturales de La Plata. En el transcurso de 1966 se efectuaron varias experiencias con el objeto de profundizar los estudios sobre "autoinhibidores" cuya acción provocaría la detención del crecimiento en cultivos masivos de *Scenedesmus obliquus*. Para las pruebas realizadas hasta entonces se utilizaron clones provenientes de un cultivo unialgal no axénico, en estado de relativa pureza.

Una serie de esas pruebas consistió en mantener cultivos masivos en condiciones controladas, hasta observar una franca estabilización del crecimiento. Posteriormente, mediante filtrado, fueron separadas las algas del medio de cultivo líquido, y sobre éste se trató de establecer la presencia de uno o varios "autoinhibidores" del crecimiento.

Durante una de las experiencias debió detenerse el cultivo masivo, por cuanto la suspensión de algas presentaba francos indicios de contaminación. Dichos indicios acabaron por confirmarse al establecer la presencia de bacterias y hongos en pruebas realizadas sobre caldo y agar peptonado.

En razón de las dificultades surgidas, los esfuerzos fueron dirigidos a la obtención de un cultivo axénico de *Scenedesmus obliquus*, requisito indispensable para un estudio concluyente de "autoinhibidores". Queda claro, por lo demás, que la obtención de dicho cultivo implica la anulación de interferencias metabólicas extrañas y por ende, evita la distorsión de los resultados y el arribo a conclusiones falsas.

MATERIAL Y METODOS

Para la obtención del cultivo axénico se procedió de acuerdo al desarrollo de la siguiente metodología: en primer lugar se efectuó la centrifugación de una suspensión de algas y luego de eliminar el

líquido sobrenadante el material fue resuspendido y tratado durante 5 minutos con solución al 20 % de D.G.6¹.

Posteriormente se efectuaron repetidos lavados por centrifugación a 1000 revoluciones durante 2 minutos, con agua destilada estéril.

Eliminada así parte de la contaminación, se realizó un recuento del número de algas por volumen, en cámara de Neubauer.

A partir de la concentración obtenida se hicieron diluciones progresivas de 1:100; 1:1000 y 1:10.000.

Una gota de cada una de las diluciones fue sembrada en cajas de Petri con medio de cultivo agar-Detmer y luego extendida con espátula de Drigalsky esterilizada a la llama.

Las cajas de Petri permanecieron en cámara de crecimiento por espacio de 10 a 20 días, hasta la aparición de las colonias de algas, lo cual permitió elegir la concentración adecuada para su aislamiento.

Las colonias más convenientes fueron tomadas con ansa de platino, suspendidas en agua destilada estéril y el grado de contaminación se comprobó sobre agar peptonado.

A continuación las algas fueron sembradas y extendidas en nuevas cajas de Petri, de acuerdo al método descrito más arriba. Al cabo de dos semanas aproximadamente, las nuevas colonias fueron aisladas y resuspendidas en agua destilada estéril y luego de efectuado el control del grado de contaminación en agar peptonado, las algas se sembraron en estrías en una serie de 10 tubos de ensayo con agar-Detmer en "pico de flauta" y se depositaron en una cámara de cultivo hasta obtener un franco crecimiento.

La superficie de agar de cada tubo fue luego prolija y rápidamente tratada por lavado con solución de oxiquinolina al 10 %, empleándose 2.5 cc para cada tubo.

Dos nuevos lavados con la misma solución se realizaron con un intervalo de 72 horas.

Al cabo de una semana, a partir del tubo de mayor crecimiento el material fue repicado a nuevos tubos de ensayo con agar-Detmer. Efectuada la prueba de esterilidad, la nueva serie se ubicó en la cámara de crecimiento hasta desarrollo visible de la estría. A continuación se efectuó un prolijo y rápido lavado con mezcla 1:1 de

¹ Germicida cuyo componente activo es cloruro del éster alifático del etilaminoetanol piridonio.

p-hidroxibenzoato de metilo al 12,5 % y p-hidroxibenzoato de propilo al 7,5 %. El lavado fue repetido a las 72 horas.

A la semana siguiente el material fue nuevamente repicado en tubos de ensayo con agar-Detmer, y la prueba de esterilidad en caldo y agar peptonado indicó que estaba libre de contaminación para estos medios de cultivo.

El material de vidrio empleado en todas las etapas del trabajo fue esterilizado en autoclave, y las operaciones se efectuaron bajo campana de vidrio, previamente irradiada con luz ultravioleta durante 24 horas.

RESULTADOS

A partir de una suspensión de algas contaminada con bacterias y hongos, por aplicación de la metodología descripta, se obtuvo un cultivo de *Scenedesmus obliquus* axénico en pruebas de esterilidad sobre agar y caldo peptonado.

La técnica de las diluciones permitió escoger la concentración más conveniente para aislar las primeras colonias algales.

La repetición de este paso y la siembra posterior en tubos de ensayo mostraron ser eficaces en la disminución progresiva de la contaminación a través de las pruebas de esterilidad. El lavado de las estrías con soluciones bacteriostáticas y micostáticas completaron la eliminación de la flora contaminante.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ACCORINTI, J., 1960. *Cultivo unialgal y masivo de "Scenedesmus obliquus" Torp. Ktz. Técnicas de obtención.* Com. Mus. Arg. Cs. Nat. Bs. As., 1 n° 9, Cienc. Bot.: 21-29.
- BOLD, H. C., 1942. *The cultivation of algae.* Bot. Rev., 8, n° 2: 133 págs.
- CATALDI, M. S., 1941. *Aislamiento en cultivo puro de cianofíceas y algas monoce-lulares.* Darwiniana, 5: 228-230.
- KUFFERATH, H., 1929. *La culture des algues.* Rev. Algologique, 4: 127-346.
- GOLDZWEIG-SHELUBSKY, M., 1951. *The use of antibiotic substances for obtaining monoalgal bacteria free cultures.* Palestine Jour. Bot. Jerusalem Ser. 5: 129-131.

- PAPPAS, G. and HOFFMAN, H., 1952. *The use of antibiotics for obtaining bacteria free cultures of Euglena*. Ohio Jour. Sc., 52,2: 102.
- TRAINOR, F., 1963. *The morphology of a Scenedesmus in pure and contaminated culture*. Bull. Torrey Bot. Cl. 90 n° 6: 137-138.
- WIEDEMAN, V., WALNE, P., and TRAINOR, F., 1964. *A new technique for obtaining axenic cultures of algae*. Can. Jour. of Bot. 42, n° 7: 958-969.